

08/11/284

b

PRIORITY DOCUMENT

REC'D 15 AOUT 1995

WIPO PCT

BREVETS D'INVENTION

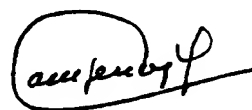
CERTIFICATS D'UTILITÉ - CERTIFICATS D'ADDITION

Copie officielle

Le Directeur général de l'Institut national de la propriété industrielle certifie que le document ci-annexé est la copie certifiée conforme, d'une demande de titre de propriété industrielle déposée à l'Institut.

Fait à Paris le 25 JUIN 1995

Pour le Directeur général de l'Institut
national de la propriété industrielle
Le Chef de Division



Yves CAMPENON



REQUETE
EN DÉLIVRANCE D'UN
TITRE DE PROPRIÉTÉ
INDUSTRIELLE ***2 OPTIONS OBLIGATOIRES** au moment du dépôt (sauf pour le certificat d'utilité)LE DEMANDEUR REQUIERT
L'ÉTABLISSEMENT DIFFERÉ
DU RAPPORT DE RECHERCHE☐ OUI☒ NONSI L'OPTION CHOISIE EST NON ET
SI LE DEMANDEUR EST UNE
PERSONNE PHYSIQUE
REQUIERT LE PAIEMENT
ÉCHELONNÉ DE LA REDEVANCE
DE RAPPORT DE RECHERCHE☐ OUI☒ NON

NATURE

NUMERO

DATE DE LA DEMANDE INITIALE

- a ☒ BREVET D'INVENTION
b ☐ CERTIFICAT D'UTILITÉ
c ☐ DEMANDE DIVISIONNAIRE
d ☐ TRANSFORMATION D'UNE
DEMANDE DE BREVET EUROPÉEN

Pour être classée, la nature de la demande doit être indiquée

3 NOM ET ADRESSE DU DEMANDEUR ou du mandataire à qui toute la correspondance doit être adressée

RHONE-POULENC RORER S.A.
Direction Brevets
20, av Raymond Aron
92165 Antony Cedex

5 RÉFÉRENCE DU CORRESPONDANT

ST 94065

6 TÉLÉPHONE DU CORRESPONDANT

40 91 69 22

4 NUMÉRO DU POUVOIR PERMANENT

15 janvier 1991

DATE DE REMISE DES PIÈCES

12 AOUT 1994

N° D'ENREGISTREMENT NATIONAL

94 09982 -

CODE POSTAL DU LIEU DE DÉPÔT

DATE DE DÉPÔT

12 AOUT 1994

7 TITRE DE L'INVENTION

ADENOVIRUS COMPRENANT UN GENE CODANT POUR LA GLUTATHION PEROXYDASE

8 DEMANDEUR(S) : Nom et Prénoms (souligner le nom patronymique) ou dénomination et forme juridique

N° SIREN

RHONE-POULENC RORER S.A.

CENTRE NATIONAL DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE

9 ADRESSE(S) COMPLETE(S)

20, av Raymond Aron, 92160 Antony
3, rue Michel Ange, 75016 Paris

PAYS

FRANCE

FRANCE

10 NATIONALITÉ(S)

française

☒ DE DÉPÔT

REDEVANCES VERSÉES

☒ DE RAPPORT DE RECHERCHE☐ DE REVENDICATION DE PRIORITÉ☒ DE REVENDICATION (à partir de la 11e)**11 INVENTEUR(S)**LE DEMANDEUR EST L'UNIQUE
INVENTEUR☐ OUI

Si la réponse est non voir notice explicative

☒ NON**12**SI LE DEMANDEUR EST UNE PERSONNE
PHYSIQUE NON IMPOSABLE
REQUIERT-IL LA RÉDUCTION
DES REDEVANCES☐ OUI☒ NON**13 DÉCLARATION DE PRIORITÉ**

OU REQUÊTE DU BÉNÉFICE DE

LA DATE DE DÉPÔT D'UNE

DEMANDE ANTÉRIEURE

PAYS D'ORIGINE

DATE DE DÉPÔT

NUMÉRO

14

DIVISIONS

ANTÉRIEURES À LA
PRÉSENTE DEMANDE

SIGNATURE DU PRÉPOSÉ À LA RÉCEPTION

SIGNATURE APRÈS ENREGISTREMENT DE LA DEMANDE À L'INPI

RHONE-POULENC RORER S.A.

Fondé de Pouvoir

Pascale LE COUPANEC

* Cocher la case choisie

LES ENCADRÉS GRAS SONT RÉSERVÉS À L'ADMINISTRATION

Division Administrative des Brevets

DÉSIGNATION DE L'INVENTEUR ST 94065
(si le demandeur n'est pas l'inventeur ou l'unique inventeur)

N° d'enregistrement national

9409982

Titre de l'invention :

ADENOVIRUS COMPRENANT UN GENE CODANT POUR LA GLUTATHION PEROXYDASE

Le (s) soussigné (s)

RHONE-POULENC RORER S.A., 20, av Raymond Aron, 92160 Antony, FRANCE
CENTRE NATIONAL DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE, 3, rue Michel Ange, 75016 Paris,
FRANCE

désigne (nt) en tant qu'inventeur (s) (indiquer nom, prénoms, adresse et souligner le nom
patronymique) :

BARKATS Martine, 7, rue Nicolas Houel, 75005 Paris, FRANCE

MALLET Jacques, 18, rue Charcot, 75013 Paris, FRANCE

REVAH Frédéric, 49, rue de Châtenay, Bât. Flandre 2, 92160 Antony, FRANCE

NOTA : A titre exceptionnel, le nom de l'inventeur peut être suivi de celui de la société à laquelle il appartient
(société d'appartenance) lorsque celle-ci est différente de la société déposante ou titulaire.

Date et signature (s) du (des) demandeur (s) ou du mandataire Antony, le 12 août 1994

RHONE-POULENC RORER S.A.
Fondé de Pouvoir


Pascale LE COUPANEC

La présente invention concerne des adénovirus recombinants comprenant une séquence d'ADN codant pour la glutathion peroxydase et ses utilisations en thérapie génique.

5 La glutathion peroxydase est une des enzymes qui intervient activement dans la régulation des concentrations en radicaux libres dérivés de l'oxygène, formés lors de divers processus physiologiques ou pathologiques.

Normalement, la formation de ces radicaux, hautement réactifs, comme l'anion superoxyde, le peroxyde d'hydrogène et le radical hydroxyle est contrôlée comme suit:
10 l'anion superoxyde est rapidement converti en peroxyde d'hydrogène, grâce à la superoxyde dismutase, puis ce peroxyde d'hydrogène est converti en oxygène et eau, par la catalase ou en particulier la glutathion peroxydase.

Habituellement, ces enzymes sont présentes dans pratiquement tous les tissus.

Toutefois, sous certaines conditions, ces mécanismes de régulation ne sont pas
15 totalement efficaces. En particulier, il peut exister un déséquilibre entre leurs concentrations respectives, par exemple une concentration excessive en superoxyde dismutase comparativement à la quantité disponible de glutathion peroxydase, ce qui conduit à une production pathologique de peroxyde d'hydrogène et de radicaux libres (radicaux hydroxyle en particulier).

20 Ces radicaux libres peuvent directement induire une peroxydation des lipides membranaires, inactiver les enzymes en peroxydant leurs groupements sulfhydryle, dépolymériser des polysaccharides et/ou endommager des acides nucléiques, entraînant dans tous les cas des pathologies graves. Ils peuvent être ainsi à l'origine d'inflammations, d'emphysèmes, de néoplasmes et/ou de rétinopathies. Ils semblent
25 également être impliqués dans l'athérosclérose, l'ischémie cérébrale, les traumatismes crâniens, le syndrome de détresse respiratoire, les maladies cardiovasculaires, le diabète, la cirrhose du foie et la formation de cataractes ainsi que dans le processus de vieillissement. Les radicaux libres seraient également liés au processus d'apoptose et pourraient intervenir dans la mort cellulaire accompagnant le syndrome
30 d'immunodéficience acquise (SIDA), [The J. of Biol. Chem., 269, 2(14), 798-801, (1994).] Plus récemment, il a été mis en évidence que des réactions entre ces radicaux ou avec des neurotransmetteurs conduisaient à la formation de neurotoxines endogènes. Les radicaux libres sont donc également impliqués dans des pathologies neurologiques comme la maladie d'Alzheimer, la maladie de Parkinson, la sclérose
35 latérale amyotrophique (ALS) et/ou la trisomie 21.

En conséquence, il serait particulièrement précieux de disposer aujourd'hui de médicaments qui puissent accroître ou réguler la concentration en glutathion peroxydase au niveau de l'organisme et qui soient donc efficaces pour traiter l'ensemble des pathologies précitées.

5 La présente invention réside précisément dans la mise au point de vecteurs particulièrement efficaces pour délivrer in vivo et de manière localisée, des quantités thérapeutiquement actives du gène spécifique codant pour la glutathion peroxydase ou l'un de ses dérivés.

10 Dans la demande correspondante n° PCT/EP93/02519, il a été montré que les adénovirus pouvaient être utilisés comme vecteur pour le transfert d'un gène étranger in vivo dans le système nerveux et l'expression de la protéine correspondante.

La présente invention concerne plus particulièrement des constructions nouvelles, particulièrement adaptées et efficaces pour contrôler l'expression de la glutathion peroxydase.

15 Plus précisément, elle se rapporte à un adénovirus recombinant comprenant une séquence d'ADN propre à contrôler l'expression d'une glutathion peroxydase, son utilisation pour des traitements thérapeutiques et/ou la prévention de diverses pathologies.

20 La demanderesse a ainsi mis en évidence qu'il est possible de construire des adénovirus recombinants contenant une séquence codant pour une glutathion peroxydase, d'administrer ces adénovirus recombinants in vivo, et que cette administration permet une expression stable et localisée de quantités thérapeutiquement actives de la glutathion peroxydase in vivo.

25 Un premier objet de l'invention réside donc dans un adénovirus recombinant défectif comprenant au moins une séquence d'ADN codant pour tout ou une partie active d'une glutathion peroxydase ou l'un de ses dérivés.

30 Au sens de la présente invention on entend désigner par glutathion peroxydase toute enzyme possédant l'activité de la glutathion peroxydase. A titre illustratif de ces enzymes on peut en particulier citer chez l'homme les glutathions peroxydases, GPX1, GPX2, GPX3 et GPX4. Les GPX1 et GPX4 sont exprimées dans la plupart des tissus avec une nette prépondérance dans les érythrocytes, le foie et le rein, pour GPX1 (Chambers et al; EMBO J 5: 1221-1227 (1986)) et les testicules pour GPX4 [Roveri et al; J. Biol. Chem. 267:6142-6146 (1992)]. GPX3 est produite dans

le rein, le poumon, le coeur, le sein, le placenta ainsi que dans le foie (Chu et al. Blood 79: 3233-3238 (1992)) quant à la GPX2, elle a principalement été mise en évidence dans les tissus gastrointestinaux et dans le foie [Chu et al. J. Biol. Chem. 268: 2571-257 (1993)].

5 La glutathion peroxydase produite dans le cadre de la présente invention peut être une glutathion peroxydase humaine ou animale. Il peut en particulier s'agir de la glutathion peroxydase bovine.

La séquence d'ADN codant pour la glutathion peroxydase, utilisée dans le cadre de la présente invention peut être un ADNc, un ADN génomique (ADNg), ou
10 une construction hybride consistant par exemple en un ADNc dans lequel seraient insérés un ou plusieurs introns. La séquence nucléique de l'ADNc codant pour la glutathion peroxydase humaine a été décrite par [Mullenbach et al., Oxy-Radicals in Molecular Biology and Pathology, 313-326, (1988)]. Il peut également s'agir de séquences synthétiques ou semisynthétiques.

15 De manière particulièrement avantageuse, on utilise un ADNc ou un ADNg.

Selon un mode préféré de l'invention, il s'agit une séquence d'ADN génomique (ADNg) codant pour une glutathion peroxydase. Son utilisation peut permettre une meilleure expression dans les cellules humaines.

Bien entendu, préalablement à son incorporation dans un vecteur adénovirus
20 selon l'invention, la séquence d'ADN peut être avantageusement modifiée, par exemple par mutagenèse dirigée, en particulier pour l'insertion de sites de restriction appropriés. Les séquences décrites dans l'art antérieur ne sont en effet pas construites pour une utilisation selon l'invention, et des adaptations préalables peuvent s'avérer nécessaires, pour obtenir des expressions importantes.

25 Au sens de la présente invention, on entend par dérivé, toute séquence obtenue par modification et codant pour un produit conservant l'une au moins des propriétés biologiques de la glutathion peroxydase. Par modification, on doit entendre toute mutation, substitution, délétion, addition ou modification de nature génétique et/ou chimique. Ces modifications peuvent être réalisées par les techniques connues de
30 l'homme du métier (voir techniques générales de biologie moléculaire ci-après). Les dérivés au sens de l'invention peuvent également être obtenus par hybridation à partir de banques d'acides nucléiques, en utilisant comme sonde la séquence native de la glutathion peroxydase ou un fragment de celle-ci.

Ces dérivés sont notamment des molécules ayant une plus grande affinité pour leurs sites de fixation, des séquences permettant une expression améliorée *in vivo*, des molécules présentant une plus grande résistance aux protéases, des molécules ayant une efficacité thérapeutique plus grande ou des effets secondaires moindres, ou éventuellement de nouvelles propriétés biologiques.

5 Parmi les dérivés préférés, on peut citer plus particulièrement les variants naturels, les molécules dans lesquelles un ou plusieurs résidus ont été substitués, les dérivés obtenus par délétion de régions n'intervenant pas ou peu dans l'interaction avec les sites de liaison considérés ou exprimant une activité indésirable, et les dérivés
10 comportant par rapport à la séquence native des résidus supplémentaires, tels que par exemple un signal de sécrétion et/ou un peptide de jonction.

La séquence d'ADN, codant pour tout ou partie d'une glutathion peroxydase ou l'un de ses dérivés, peut également être une séquence antisens, dont l'expression dans la cellule cible permet de contrôler l'expression de cette enzyme.
15 Préférentiellement, la séquence d'ADN hétérologue comporte un gène codant pour un ARN antisens capable de contrôler la traduction de l'ARNm correspondant. La séquence antisens peut être tout ou seulement une partie de la séquence d'ADN, codant pour une glutathion peroxydase, insérée dans l'orientation inverse dans le vecteur selon l'invention.

20 Selon un mode de réalisation de l'invention, la séquence d'ADN, codant pour une glutathion peroxydase ou l'un de ses dérivés, peut également intégrer un signal de sécrétion permettant de diriger la glutathion peroxydase synthétisée dans les voies de sécrétion des cellules infectées. De cette manière, la glutathion peroxydase synthétisée est avantageusement libérée dans les compartiments extracellulaires.

25 Avantageusement, la séquence codant pour la glutathion peroxydase est placée sous le contrôle de signaux permettant son expression dans les cellules cibles. Préférentiellement, il s'agit de signaux d'expression hétérologues, c'est-à-dire de signaux différents de ceux naturellement responsables de l'expression de la glutathion peroxydase. Il peut s'agir en particulier de séquences responsables de l'expression
30 d'autres protéines, ou de séquences synthétiques. Notamment, il peut s'agir de séquences promotrices de gènes eucaryotes ou viraux. Par exemple, il peut s'agir de séquences promotrices issues du génome de la cellule que l'on désire infecter. De même, il peut s'agir de séquences promotrices issues du génome d'un virus, y compris l'adénovirus utilisé. A cet égard, on peut citer par exemple les promoteurs E1A, MLP,
35 CMV, LTR-RSV, etc. En outre, ces séquences d'expression peuvent être modifiées

par addition de séquences d'activation, de régulation, ou permettant une expression tissu-spécifique. Il peut en effet être particulièrement intéressant d'utiliser des signaux d'expression actifs spécifiquement ou majoritairement dans les cellules cibles, de manière à ce que la séquence d'ADN ne soit exprimée et ne produise son effet que

5 lorsque le virus a effectivement infecté une cellule cible.

Dans un premier mode de réalisation particulier, l'invention concerne un adénovirus recombinant défectif comprenant une séquence d'ADNc ou ADN8 codant pour une glutathion peroxydase bovine sous le contrôle du promoteur LTR-RSV.

Dans un autre mode de réalisation particulier, l'invention concerne un

10 adénovirus recombinant défectif comprenant une séquence d'ADNg codant pour la glutathion peroxydase humaine sous le contrôle du promoteur LTR-RSV.

Un mode particulièrement préféré de mise en oeuvre de la présente invention réside dans un adénovirus recombinant défectif comprenant les séquences ITR, une séquence permettant l'encapsidation, une séquence d'ADN codant pour la glutathion

15 peroxydase humaine ou un dérivé de celle-ci sous le contrôle d'un promoteur permettant une expression majoritaire dans les tissus cibles et dans lequel le gène E1 et au moins un des gènes E2, E4, L1-L5 est non fonctionnel.

Les adénovirus défectifs selon l'invention sont des adénovirus incapables de se répliquer de façon autonome dans la cellule cible. Généralement, le génome des

20 adénovirus défectifs utilisés dans le cadre de la présente invention est donc dépourvu au moins des séquences nécessaires à la réplication dudit virus dans la cellule infectée. Ces régions peuvent être soit éliminées (en tout ou en partie), soit rendues non-fonctionnelles, soit substituées par d'autres séquences et notamment par la séquence d'ADN codant pour la glutathion peroxydase.

Préférentiellement, le virus défectif de l'invention conserve les séquences de son génome qui sont nécessaires à l'encapsidation des particules virales. Encore plus

25 préférentiellement, comme indiqué ci-avant, le génome du virus recombinant défectif selon l'invention comprend les séquences ITR, une séquence permettant l'encapsidation, le gène E1 non fonctionnel et au moins un des gènes E2, E4, L1-L5

30 non fonctionnel.

Il existe différents sérotypes d'adénovirus, dont la structure et les propriétés varient quelque peu. Parmi ces sérotypes, on préfère utiliser dans le cadre de la

35 présente invention les adénovirus humains de type 2 ou 5 (Ad 2 ou Ad 5) ou les adénovirus d'origine animale (voir demande FR 93 05954). Parmi les adénovirus d'origine animale utilisables dans le cadre de la présente invention on peut citer les

adénovirus d'origine canine, bovine, murine, [exemple : Mav1, Beard et al., Virology 75 (1990) 81], ovine, porcine, aviaire ou encore simienne (exemple : SAV). De préférence, l'adénovirus d'origine animale est un adénovirus canin, plus préférentiellement un adénovirus CAV2 [souche manhattan ou A26/61 (ATCC VR-800) par exemple]. De préférence, on utilise dans le cadre de l'invention des adénovirus d'origine humaine ou canine ou mixte.

Les adénovirus recombinants défectifs selon l'invention peuvent être préparés par toute technique connue de l'homme du métier (Levrero et al., Gene 101 (1991) 195, EP 185 573; Graham, EMBO J. 3 (1984) 2917). En particulier, ils peuvent être préparés par recombinaison homologue entre un adénovirus et un plasmide portant entre autre la séquence d'ADN codant pour la glutathion peroxydase. La recombinaison homologue se produit après co-transfection desdits adénovirus et plasmide dans une lignée cellulaire appropriée. La lignée cellulaire utilisée doit de préférence (i) être transformable par lesdits éléments, et (ii), comporter les séquences capables de compléter la partie du génome de l'adénovirus défectif, de préférence sous forme intégrée pour éviter les risques de recombinaison. A titre d'exemple de lignée, on peut mentionner la lignée de rein embryonnaire humain 293 (Graham et al., J. Gen. Virol. 36 (1977) 59) qui contient notamment, intégrée dans son génome, la partie gauche du génome d'un adénovirus Ad5 (12 %). Des stratégies de construction de vecteurs dérivés des adénovirus ont également été décrites dans les demandes n° FR 93 05954 et FR 93 08596 qui sont incorporées à la présente demande par référence.

Ensuite, les adénovirus qui se sont multipliés sont récupérés et purifiés selon les techniques classiques de biologie moléculaire, comme illustré dans les exemples.

Les propriétés particulièrement avantageuses des vecteurs de l'invention découlent notamment de la construction utilisée (adénovirus défectif, délété de certaines régions virales), du promoteur utilisé pour l'expression de la séquence codant pour la glutathion peroxydase (promoteur viral ou tissu-spécifique de préférence), et des méthodes d'administration dudit vecteur, permettant l'expression efficace et dans les tissus appropriés de ladite enzyme.

La présente invention concerne également toute utilisation d'un adénovirus tel que décrit ci-dessus pour la préparation d'une composition pharmaceutique destinée au traitement et/ou à la prévention des pathologies précédemment citées. Plus

particulièrement, elle concerne toute utilisation de ces adénovirus pour la préparation d'une composition pharmaceutique destinée au traitement et/ou à la prévention des maladies neurodégénératives comme par exemple la maladie de Parkinson, la maladie d'Alzheimer, la sclérose latérale amyotrophique (ALS), et la trisomie 21. Ils peuvent
 5 être également avantageusement utilisés dans le traitement de l'athérosclérose, les maladies cardiovasculaires, la cirrhose du foie, le diabète, la formation de cataracte, l'ischémie cérébrale, les traumatismes crâniens, le syndrome de détresse respiratoire (ARDS), les maladies liées à une déficience immunitaires, les cancers ainsi que dans le processus de vieillissement.

10 La présente invention concerne également une composition pharmaceutique comprenant un ou plusieurs adénovirus recombinants défectifs tels que décrits précédemment. Ces compositions pharmaceutiques peuvent être formulées en vue d'administrations par voie topique, orale, parentérale, intranasale, intraveineuse, intramusculaire, sous-cutanée, intraoculaire, transdermique, etc. De préférence, les
 15 compositions pharmaceutiques de l'invention contiennent un véhicule pharmaceutiquement acceptable pour une formulation injectable, notamment pour une injection directe chez le patient. Il peut s'agir en particulier de solutions stériles, isotoniques, ou de compositions sèches, notamment lyophilisées, qui, par addition selon le cas d'eau stérilisée ou de sérum physiologique, permettent la constitution de solutés injectables.

20 A cet égard, l'invention concerne également une méthode de traitement des maladies neurodégénératives comprenant l'administration à un patient d'un adénovirus recombinant tel que défini ci-avant. Plus particulièrement, l'invention concerne une méthode de traitement des maladies neurodégénératives comprenant l'administration stéréotaxique d'un adénovirus recombinant tel que défini ci-avant.

25 Les doses d'adénovirus recombinant défectif utilisées pour l'injection peuvent être adaptées en fonction de différents paramètres, et notamment en fonction du mode d'administration utilisé, de la pathologie concernée ou encore de la durée du traitement recherchée. D'une manière générale, les adénovirus recombinants selon l'invention sont formulés et administrés sous forme de doses comprises entre 10^4 et 10^{14} pfu/ml, et de
 30 préférence 10^6 à 10^{10} pfu/ml. Le terme pfu ("plaque forming unit") correspond au pouvoir infectieux d'une solution de virus, et est déterminé par infection d'une culture cellulaire appropriée, puis mesure, généralement après 48 heures, du nombre de plaques de cellules infectées. Les techniques de détermination du titre pfu d'une solution virale sont bien documentées dans la littérature.

Un autre objet de l'invention concerne toute cellule de mammifère infectée par un ou plusieurs adénovirus recombinants défectifs tels que décrits ci-dessus. Plus particulièrement, l'invention concerne toute population de cellules humaines infectée par ces adénovirus. Il peut s'agir en particulier de fibroblastes, myoblastes, hépatocytes, kératinocytes, cellules endothéliales, cellules Gliales, etc.

Les cellules selon l'invention peuvent être issues de cultures primaires. Celles-ci peuvent être prélevées par toute technique connue de l'homme du métier, puis mises en culture dans des conditions permettant leur prolifération. S'agissant plus particulièrement de fibroblastes, ceux-ci peuvent être aisément obtenus à partir de biopsies, par exemple selon la technique décrite par Ham [Methods Cell.Biol. 21a (1980) 255]. Ces cellules peuvent être utilisées directement pour l'infection par les adénovirus, ou conservées, par exemple par congélation, pour l'établissement de banques autologues, en vue d'une utilisation ultérieure. Les cellules selon l'invention peuvent également être des cultures secondaires, obtenues par exemple à partir de banques préétablies.

Les cellules en culture sont ensuite infectées par des adénovirus recombinants, pour leur conférer la capacité de produire de la glutathion peroxydase. L'infection est réalisée in vitro selon des techniques connues de l'homme du métier. En particulier, selon le type de cellules utilisé et le nombre de copies de virus par cellule désiré, l'homme du métier peut adapter la multiplicité d'infection. Il est bien entendu que ces étapes doivent être effectuées dans des conditions de stérilité appropriées lorsque les cellules sont destinées à une administration in vivo. Les doses d'adénovirus recombinant utilisées pour l'infection des cellules peuvent être adaptées par l'homme du métier selon le but recherché. Les conditions décrites ci-avant pour l'administration in vivo peuvent être appliquées à l'infection in vitro.

Un autre objet de l'invention concerne un implant comprenant des cellules mammifère infectées par un ou plusieurs adénovirus recombinants défectifs telles que décrites ci-dessus, et une matrice extracellulaire. Préférentiellement, les implants selon l'invention comprennent 10^5 à 10^{10} cellules. Plus préférentiellement, ils en comprennent 10^6 à 10^8 .

Plus particulièrement, dans les implants de l'invention, la matrice extracellulaire comprend un composé gélifiant et éventuellement un support permettant l'ancrage des cellules.

Pour la préparation des implants selon l'invention, différents types de gélifiants peuvent être employés. Les gélifiants sont utilisés pour l'inclusion des cellules dans une matrice ayant la constitution d'un gel, et pour favoriser l'ancrage des cellules sur le support, le cas échéant. Différents agents d'adhésion cellulaire peuvent donc être
 5 utilisés comme gélifiants, tels que notamment le collagène, la gélatine, les glycosaminoglycans, la fibronectine, les lectines, l'agarose etc.

Comme indiqué ci-avant, les compositions selon l'invention comprennent avantageusement un support permettant l'ancrage des cellules. Le terme ancrage désigne toute forme d'interaction biologique et/ou chimique et/ou physique entraînant
 10 l'adhésion et/ou la fixation des cellules sur le support. Par ailleurs, les cellules peuvent soit recouvrir le support utilisé, soit pénétrer à l'intérieur de ce support, soit les deux. On préfère utiliser dans le cadre de l'invention un support solide, non toxique et/ou bio-compatible. En particulier, on peut utiliser des fibres de polytétrafluoroéthylène (PTFE) ou un support d'origine biologique.

Les implants selon l'invention peuvent être implantés en différents sites de l'organisme. En particulier, l'implantation peut être effectuée au niveau de la cavité péritonéale, dans le tissu sous-cutané (région sus-pubienne, fosses iliaques ou inguinales, etc), dans un organe, un muscle, une tumeur, le système nerveux central, ou encore sous une muqueuse. Les implants selon l'invention sont particulièrement
 20 avantageux en ce sens qu'ils permettent de contrôler la libération du produit thérapeutique dans l'organisme : Celle-ci est tout d'abord déterminée par la multiplicité d'infection et par le nombre de cellules implantées. Ensuite, la libération peut être contrôlée soit par le retrait de l'implant, ce qui arrête définitivement le traitement, soit par l'utilisation de systèmes d'expression régulable, permettant d'induire ou de réprimer
 25 l'expression des gènes thérapeutiques.

La présente invention fournit ainsi des vecteurs viraux utilisables directement en thérapie génique, particulièrement adaptés et efficaces pour diriger l'expression de la glutathion peroxydase in vivo. La présente invention offre ainsi une nouvelle
 30 approche particulièrement avantageuse pour le traitement et/ou la prévention de nombreuses pathologies comme celles citées précédemment.

Les vecteurs adénoviraux selon l'invention présentent en outre des avantages importants, liés notamment à leur très haute efficacité d'infection des cellules cibles, permettant de réaliser des infections à partir de faibles volumes de suspension virale. De plus, l'infection par les adénovirus de l'invention est très localisée au site d'injection,
 35 ce qui évite les risques de diffusion aux structures cérébrales voisines. Ce traitement

peut concerner aussi bien l'homme que tout animal tel que les ovins, les bovins, les murins, les animaux domestiques (chiens, chats, etc), les chevaux, les poissons, etc.

On peut en outre, parfaitement envisager de procéder à une administration conjointe d'un adénovirus selon l'invention avec au moins un second adénovirus
5 comportant un gène codant pour une des formes de la superoxyde dismutase ou la catalase.

Les exemples sont présentés ci-après à titre illustratif et non limitatif du
10 domaine de l'invention.

Techniques générales de biologie moléculaire

Les méthodes classiquement utilisées en biologie moléculaire telles que les extractions préparatives d'ADN plasmidique, la centrifugation d'ADN plasmidique en gradient de chlorure de césium, l'électrophorèse sur gels d'agarose ou d'acrylamide, la
15 purification de fragments d'ADN par électroélution, les extraction de protéines au phénol ou au phénol-chloroforme, la précipitation d'ADN en milieu salin par de l'éthanol ou de l'isopropanol, la transformation dans *Escherichia coli*, etc ... sont bien connues de l'homme de métier et sont abondamment décrites dans la littérature [Maniatis T. et al., "Molecular Cloning, a Laboratory Manual", Cold Spring Harbor
20 Laboratory, Cold Spring Harbor, N.Y., 1982; Ausubel F.M. et al. (eds), "Current Protocols in Molecular Biology", John Wiley & Sons, New York, 1987].

Les plasmides de type pBR322, pUC et les phages de la série M13 sont d'origine commerciale (Bethesda Research Laboratories).

Pour les ligatures, les fragments d'ADN peuvent être séparés selon leur taille
25 par électrophorèse en gels d'agarose ou d'acrylamide, extraits au phénol ou par un mélange phénol/chloroforme, précipités à l'éthanol puis incubés en présence de l'ADN ligase du phage T4 (Biolabs) selon les recommandations du fournisseur.

Le remplissage des extrémités 5' proéminentes peut être effectué par le fragment de Klenow de l'ADN Polymérase I d'*E. coli* (Biolabs) selon les spécifications
30 du fournisseur. La destruction des extrémités 3' proéminentes est effectuée en présence de l'ADN Polymérase du phage T4 (Biolabs) utilisée selon les recommandations du fabricant. La destruction des extrémités 5' proéminentes est effectuée par un traitement ménagé par la nucléase S1.

La mutagenèse dirigée in vitro par oligodéoxynucléotides synthétiques peut
35 être effectuée selon la méthode développée par Taylor et al. [Nucleic Acids Res. 13 (1985) 8749-8764] en utilisant le kit distribué par Amersham.

L'amplification enzymatique de fragments d'ADN par la technique dite de PCR [Polymérase-catalyzed Chain Reaction, Saiki R.K. et al., Science 230 (1985) 1350-1354; Mullis K.B. et Faloona F.A., Meth. Enzym. 155 (1987) 335-350] peut être effectuée en utilisant un "DNA thermal cyclor" (Perkin Elmer Cetus) selon les spécifications du fabricant.

La vérification des séquences nucléotidiques peut être effectuée par la méthode développée par Sanger et al. [Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 74 (1977) 5463-5467] en utilisant le kit distribué par Amersham.

Exemples

10 Exemple 1 : Protocole de construction du vecteur pLTRIX-bGPx

Ce vecteur contient la séquence codant pour la GPx bovine sous contrôle du LTR du virus RSV, ainsi que des séquences de l'adénovirus permettant la recombinaison in vivo. L'ADNc utilisé est décrit dans [Mullenbach et al., Oxy-Radicals in Molecular Biology and Pathology, 313-326, (1988)].

L'ADN est inséré dans le site BamHI d'un plasmide Bluescript. Une séquence de polyadénylation a été introduite dans le site XhoI de ce plasmide. Ce dernier est identifié par SK-bGPx-PolyA.

Le vecteur pLTRIX-bGPx est obtenu en introduisant dans le site EcoRV du plasmide pLTRIX un insert obtenu par coupure de SK-bGPx-PolyA

Exemple 2 : Construction d'adénovirus recombinants contenant une séquence codant pour la glutathion peroxydase bovine.

Le vecteur pLTRIX-bGPx est linéarisé et cotransfecté avec un vecteur adénoviral déficient, dans les cellules helper (lignée 293) apportant en trans les fonctions codées par les régions E1 (E1A et E1B) d'adénovirus.

Plus précisément, l'adénovirus Ad-bGPx a été obtenu par recombinaison homologue in vivo entre l'adénovirus mutant Ad-dl1324 (Thimmappaya et al., Cell 31 (1982) 543) et le vecteur pLTR IX-bGPx, selon le protocole suivant : le plasmide pLTR IX-bGPx et l'adénovirus Ad-dl1324, linéarisé par l'enzyme ClaI, ont été co-transfectés dans la lignée 293 en présence de phosphate de calcium, pour permettre la recombinaison homologue. Les adénovirus recombinants ainsi générés ont été sélectionnés par purification sur plaque. Après isolement, l'ADN de l'adénovirus

recombinant a été amplifié dans la lignée cellulaire 293, ce qui conduit à un surnageant de culture contenant l'adénovirus défectif recombinant non purifié ayant un titre d'environ 10^{10} pfu/ml.

Les particules virales sont ensuite purifiées par centrifugation sur gradient.

REVENDICATIONS

1. Adénovirus recombinant défectif comprenant au moins une séquence d'ADN codant pour tout ou une partie active d'une glutathion peroxydase ou l'un de ses dérivés.
- 5 2. Adénovirus selon la revendication 1 caractérisé en ce que la séquence d'ADN est une séquence d'ADNc.
3. Adénovirus selon la revendication 1 caractérisé en ce que la séquence d'ADN est une séquence d'ADNg.
- 10 4. Adénovirus selon la revendication 1, 2 ou 3 caractérisé en ce que la séquence d'ADN code pour une glutathion peroxydase bovine.
5. Adénovirus selon la revendication 1, 2 ou 3 caractérisé en ce que la séquence d'ADN code pour une glutathion peroxydase humaine.
- 15 6. Adénovirus selon la revendication 1 caractérisé en ce que la séquence d'ADN est une séquence antisens dont l'expression permet de contrôler l'expression du gène codant pour la glutathion peroxydase.
7. Adénovirus selon la revendication 6 caractérisé en ce qu'il s'agit d'un gène codant pour un ARN antisens capable de contrôler la traduction de l'ARNm d'une glutathion peroxydase.
- 20 8. Adénovirus selon l'une des revendications 1 à 7 caractérisé en ce que la séquence d'ADN est placée sous le contrôle de signaux permettant son expression dans les cellules cibles.
9. Adénovirus selon la revendication 8 caractérisé en ce que les signaux d'expression sont choisis parmi les promoteurs viraux, de préférence parmi les promoteurs E1A, MLP, CMV et LTR-RSV.
- 25 10. Adénovirus selon la revendication 1 comprenant une séquence d'ADNg ou d'ADNc codant pour une glutathion peroxydase bovine sous le contrôle d'un promoteur LTR-RSV.

11. Adénovirus selon la revendication 1 comprenant une séquence d'ADNg ou d'ADNc codant pour une glutathion peroxydase humaine sous le contrôle d'un promoteur LTR-RSV.

5 12. Adénovirus selon l'une des revendications 1 à 11 caractérisé en ce qu'il est dépourvu des régions de son génome qui sont nécessaires à sa réplication dans la cellule cible.

13. Adénovirus selon la revendication 12 caractérisé en ce qu'il comprend les ITR et une séquence permettant l'encapsidation, et dans lequel le gène E1 et au moins un des gènes E2, E4, L1-L5 sont non fonctionnels.

10 14. Adénovirus selon la revendication 12 ou 13 caractérisé en ce qu'il s'agit d'un adénovirus humain de type Ad 2 ou Ad 5 ou canin de type CAV-2.

15. Utilisation d'un adénovirus selon l'une des revendications 1 à 14 pour la préparation d'une composition pharmaceutique destinée au traitement et/ou à la prévention des maladies neurodégénératives.

15 16. Utilisation selon la revendication 15 pour la préparation d'une composition pharmaceutique destinée au traitement et/ou à la prévention des maladies de Parkinson, Alzheimer, Huntington, ALS, de la trisomie 21, de l'athérosclérose, des maladies cardiovasculaires, de la cirrhose du foie, du diabète, de la formation de cataracte, l'ischémie cérébrale, des traumatismes crâniens, de syndrome de détresse
20 respiratoire (ARDS), des cancers ainsi que du processus de vieillissement.

17. Composition pharmaceutique comprenant un ou plusieurs adénovirus recombinants défectifs selon l'une des revendications 1 à 15.

18. Composition pharmaceutique selon la revendication 17 caractérisée en ce qu'elle est sous forme injectable.

25 19. Composition pharmaceutique selon l'une des revendications 17 à 18 caractérisée en ce qu'elle comprend entre 10^4 et 10^{14} pfu/ml, et de préférence 10^6 à 10^{10} pfu/ml adénovirus recombinants défectifs.

20. Cellule de mammifère infectée par un ou plusieurs adénovirus recombinants défectifs selon l'une des revendications 1 à 14.

21. Cellule selon la revendication 20 caractérisée en ce qu'il s'agit d'une cellule humaine.

22. Cellule selon la revendication 21 caractérisée en ce qu'il s'agit d'une cellule humaine de type rétinienne, fibroblaste, myoblaste, hépatocyte, cellule endothéliale, cellule Gliales ou kératynocyte.

23. Implant comprenant des cellules infectées selon les revendications 20 à 22 et une matrice extracellulaire.

24. Implant selon la revendication 23 caractérisé en ce que la matrice extracellulaire comprend un composé gélifiant choisi de préférence parmi le collagène, la gélatine, les glucosaminoglycans, la fibronectine, l'agarose et les lectines.

25. Implant selon les revendications 23 ou 24 caractérisé en ce que la matrice extracellulaire comprend également un support permettant l'ancrage des cellules infectées.

26. Implant selon la revendication 25 caractérisé en ce que le support est constitué préférentiellement par des fibres de polytétrafluoroéthylène.

